

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**



DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets ⁵ : C12N 15/74, 1/21, 15/01, A61K 39/02 //C12N 15/31 (C12N 1/21, C12R 1:01)	A1	(11) Numéro de publication internationale: WO 93/15212 (43) Date de publication internationale: 5 août 1993 (05.08.93)
(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR93/00105 (22) Date de dépôt international: 1er février 1993 (01.02.93) (30) Données relatives à la priorité: 92/01128 31 janvier 1992 (31.01.92) FR (71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): INSTITUT PASTEUR [FR/FR]; 28, rue du Docteur-Roux, F-75724 Paris Cédex 15 (FR). (72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants (US seulement) : COSSART, Pascale [FR/FR]; 101, rue de la Croix-Nivet, F-75015 Paris (FR). KOCKS, Christine [FR/FR]; 121, rue Raymond-Cosserand, F-75014 Paris (FR). GOOSSENS, Pierre [FR/FR]; 51, boulevard de Charonne, F-75011 Paris (FR). MILON, Geneviève [FR/FR]; 26, rue Louis-Braille, F-75012 Paris (FR).	(74) Mandataire: LE GUEN, Gérard; Cabinet Lavoix, 2, place d'Estienne d'Orves, F-75441 Paris Cédex 09 (FR). (81) Etats désignés: CA, JP, US, brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). Publiée <i>Avec rapport de recherche internationale.</i> <i>Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si de telles modifications sont reçues.</i>	
(54) Title: ATTENUATED MUTANT OF LISTERIA MONOCYTOGENES; RECOMBINANT STRAIN OF LISTERIA MONOCYTOGENES, USE AS HETEROLOGOUS VACCINAL ANTIGENE VECTORS AND USE AS VACCINE OR DIAGNOSTIC COMPOSITION (54) Titre: MUTANT ATTENUÉ DE LISTERIA MONOCYTOGENES; SOUCHE RECOMBINANTE DE LISTERIA MONOCYTOGENES, UTILISATION COMME VECTEURS HETEROLOGUES D'ANTIGÈNE VACCINAL ET UTILISATION COMME VACCIN OU COMPOSITION DIAGNOSTIQUE (57) Abstract <p>The invention discloses an attenuated mutant of <i>Listeria monocytogenes</i> incorporating in the act A gene or in its promotor a mutation capable of blocking or modifying the expression of the protein coded by the act A gene. This mutant can be used as a living vector for the expression of an heterologous ADN, particularly a gene coding for a viral, bacterial or parasitic protector antigene which is the target of T cells of subclass CD8. The recombinant mutant strains thus obtained may be used as a vaccine or diagnostic composition for checking the protection state of a host.</p> (57) Abrégé <p>L'invention a pour objet un mutant atténué de <i>Listeria monocytogènes</i> comportant dans le gène act A ou dans le promoteur de celui-ci une mutation apte à bloquer ou modifier l'expression de la protéine codée par le gène act A. Ce mutant peut être utilisé en tant que vecteur vivant pour l'expression d'un ADN hétérologue, notamment d'un gène codant pour un antigène viral, bactérien ou parasitaire protecteur cible de lymphocytes T de la sous-classe CD8. Les souches mutantes recombinantes ainsi obtenues ont des applications en tant que vaccin ou composition de diagnostic pour le contrôle de l'état de protection d'un hôte.</p>		

FOR THE PURPOSES OF INFORMATION ONLY

Codes used to identify States party to the PCT on the front pages of pamphlets publishing international applications under the PCT.

AT	Austria	FR	France	MR	Mauritania
AU	Australia	GA	Gabon	MW	Malawi
BB	Barbados	GB	United Kingdom	NL	Netherlands
BE	Belgium	GN	Guinea	NO	Norway
BF	Burkina Faso	GR	Greece	NZ	New Zealand
BG	Bulgaria	HU	Hungary	PL	Poland
BJ	Benin	IE	Ireland	PT	Portugal
BR	Brazil	IT	Italy	RO	Romania
CA	Canada	JP	Japan	RU	Russian Federation
CF	Central African Republic	KP	Democratic People's Republic of Korea	SD	Sudan
CG	Congo	KR	Republic of Korea	SE	Sweden
CH	Switzerland	KZ	Kazakhstan	SK	Slovak Republic
CI	Côte d'Ivoire	LI	Liechtenstein	SN	Senegal
CM	Cameroon	LK	Sri Lanka	SU	Soviet Union
CS	Czechoslovakia	LU	Luxembourg	TD	Chad
CZ	Czech Republic	MC	Monaco	TG	Togo
DE	Germany	MG	Madagascar	UA	Ukraine
DK	Denmark	ML	Mali	US	United States of America
ES	Spain	MN	Mongolia	VN	Viet Nam
FI	Finland				

Mutant atténué de Listeria monocytogènes; souche recombinante de Listeria monocytogènes, utilisation comme vecteurs hétérologues d'antigène vaccinal et utilisation comme vaccin ou composition diagnostique

La présente invention concerne une souche mutante atténuée de Listeria monocytogenes et ses applications immuno-thérapeutiques et diagnostiques, notamment pour la fabrication d'une souche recombinante utilisable en tant que vaccin.

Listeria monocytogenes est un bacille aérobic facultatif, non sporulant, à gram-positif très répandu dans l'environnement et responsable de la listériose humaine et animale. La maladie se manifeste par des infections opportunistes, soit par une méningite et/ou encephalite, des septicémies ou par des avortements, avec un taux de mortalité élevé chez les nouveau-nés et les adultes dont les mécanismes de défense sont affaiblis par la grossesse, une immunosuppression thérapeutiquement induite, une maladie sous-jacente ou la vieillesse. La listériose peut aussi atteindre des sujets apparemment sains.

Listeria monocytogenes est capable in vivo comme in vitro d'infecter une grande variété de types cellulaires, notamment les macrophages, les fibroblastes, les cellules épithéliales et les entérocytes.

Après sa pénétration dans la cellule infectée, la bactérie lyse la membrane du phagosome grâce à une hémolysine qu'elle secrète. Au terme de cette étape, la bactérie est dans le cytoplasme de la cellule hôte.

En outre, Listeria monocytogenes se caractérise par son aptitude à se propager dans les tissus par infection directe de cellule à cellule sans quitter le cytoplasme (Racz et al., 1970 (9)).

Peu de temps après son entrée dans la cellule hôte, la bactérie s'entoure d'actine filamenteuse (actine F) qui est ultérieurement se réarrange en "comète" derrière la bactérie dans la direction opposée au mouve-

FEUILLE DE REMPLACEMENT

ment (Tilney et al., 1989, (13); Mounier et al., (1990) (1). L'actine polymérisée est constituée de microfiliaments courts, orientés au hasard qui diffèrent des filaments d'actine longs habituellement observés dans les cellules musculaires.

Les bactéries sont mobiles et laissent derrière elles des "comètes" d'actine F de plusieurs μm de longueur. Certaines sont incorporées dans des protubérances cytoplasmiques en forme de doigt, qui peuvent être internalisées par les cellules voisines. Les deux membranes plasmiques entourant la bactérie sont alors lysées. Une fois dans le cytoplasme de la nouvelle cellule hôte, la bactérie peut se reproduire et commencer un nouveau cycle de dissémination.

Pendant ce processus de dissémination, les cellules de Listeria monocytogenes sont protégées du système immunitaire de l'hôte, et la dissémination de cellule à cellule représente par conséquent un facteur clé de virulence.

En isolant et analysant un mutant Tn 917-Lac inapte à se disséminer de cellule à cellule, les inventeurs ont pu identifier une protéine de Listeria monocytogenes impliquée dans l'assemblage de l'actine induit par la bactérie.

Le gène codant pour cette protéine dénommée act A, fait partie d'un opéron (Mengaud et al., 1991 (b) (8)) dont la séquence nucléotidique complète a été récemment décrite (Vazquez-Boland et al., 1992 (12)).

La présente invention a ainsi pour objet une souche de Listeria monocytogenes à virulence atténuée, caractérisée en ce qu'elle comporte, dans le gène act A ou dans le promoteur de celui-ci, une mutation capable de bloquer ou de modifier sensiblement l'expression de la protéine codée par le gène act A.

La mutation peut être réalisée selon les

techniques connues, notamment par insertion dans le gène act A ou son promoteur, d'une séquence d'une ou plusieurs bases, de préférence un transposon stable, délétion d'une ou plusieurs bases, mutations telles que mutations par mutagénèse dirigée, par exemple par PCR et notamment mutations faux-sens.

La mutation peut notamment être réalisée par insertion d'un transposon, tel que le transposon Tn 917-lac, comme décrit par Mengaud et al., 1991 (a) (7).

La mutation est effectuée de préférence dans le fragment d'ADN codant pour la séquence peptidique à motifs répétés comprise entre les aminoacides 235 à 315, 350 à 360, 367 à 385 et 389 à 393 de la séquence peptidique SEQ ID N° 1.

Un autre site de mutation avantageux, notamment d'insertion est situé en aval de l'adénosine en position 497 de la séquence nucléotidique du gène act A.

Cette position correspond à celle entre les aminoacides 61 et 62 de la séquence peptidique SEQ ID N° 1.

Une souche particulièrement préférée selon la présente invention est la souche de la Listeria monocytogenes LUT 12 déposée à la Collection Nationale de Cultures de Micro-organismes (CNCM) le 30 janvier 1992 sous le numéro I-1167.

Les mutants selon l'invention sont aptes à conférer à des hôtes auxquels ils ont été administrés une protection contre une infection ultérieure par une souche pathogène de Listeria monocytogenes.

L'invention a donc également pour objet un vaccin humain ou vétérinaire comprenant en tant que composant actif une souche atténuée de Listeria monocytogenes, telle que définie précédemment.

Ce vaccin est apte à conférer une protection efficace à l'homme ou à l'animal notamment aux bovins et

ovins contre la listériose.

La réponse immunitaire générée par l'administration d'un mutant atténué tel que défini se traduit par la prolifération essentiellement de lymphocytes T de la sous-classe CD8.

Les lymphocytes T de la sous-classe CD8 sont activés par des peptides liés à des antigènes de classe I du CMH (complexe majeur d'histocompatibilité) générés par la protéolyse de protéines synthétisées ou libérées dans le cytoplasme d'une cellule présentant l'antigène.

Ainsi, les mutants atténués de Listeria monocytogenes selon l'invention, sont aptes à stimuler le système immunitaire par la voie qui utilise les molécules de classe I du CMH.

Il est par conséquent possible en transformant Listeria monocytogenes à l'aide d'un plasmide approprié d'introduire un gène hétérologue provenant de n'importe quel organisme et d'utiliser les souches recombinantes obtenues comme système d'expression d'ADN hétérologue.

L'invention a ainsi également pour objet un mutant recombinant de Listeria monocytogenes caractérisé en ce qu'il comporte un ADN hétérologue, soit inséré dans le génome d'un mutant atténué tel que défini précédemment, soit porté par un plasmide se répliquant dans le mutant atténué.

L'ADN hétérologue consiste de préférence en un gène hétérologue codant pour un antigène protecteur cible de lymphocytes T de la sous-classe CD8.

Cet antigène peut être d'origine bactérienne (par exemple de mycobactéries), parasitaire, (par exemple de Leishmania, Tripanosoma ou Toxoplasma) ou viral (virus de la grippe, virus de la chorioméningite lymphocytaire (LCMV) ou virus du Sida (VIH)).

Un mutant recombinant de Listeria monocytoge-

nes particulièrement intéressant comporte les gènes codant pour l'antigène gag et/ou l'antigène nef du VIH ou tout ou partie de l'enveloppe gp 120 du VIH 1 ou gp 140 du VIH 2 ou par un peptide tel que défini dans US-4 943 628.

La construction du mutant recombinant peut être réalisée par transformation d'un mutant atténué tel que défini ci-dessus, notamment du mutant LUT 12 à l'aide d'un plasmide approprié, et par exemple électroporation.

Avantageusement, le clonage de l'ADN hétérologue sera réalisé chez E. Coli et on utilisera un plasmide navette E. Coli - Listeria monocytogenes pour réaliser la transformation.

Comme plasmides, on peut citer pmKA 4 (Sullivan et al., (14)) ou PHT 320 (Leredus et al., (15)).

Pour permettre l'expression du gène d'intérêt (gène hétérologue), il est avantageux d'insérer en amont du gène d'intérêt un promoteur fort de *Listeria*, tel que le promoteur hly.

Pour que le produit de traduction du gène d'intérêt puisse être sécrété, il est préférable de fusionner le gène d'intérêt au début de hly afin d'utiliser "la séquence signal" de la listériolysine O pour libérer la protéine d'intérêt codée par le gène hétérologue dans le cytoplasme d'une cellule d'hôte.

Les mutants recombinants de Listeria monocytogenes tels que définis ci-dessus conviennent de manière avantageuse pour la préparation d'un vaccin recombinant humain ou vétérinaire, contre une infection provoquée par un microorganisme produisant un antigène correspondant à la protéine codée par l'ADN hétérologue inséré dans le génome de Listeria monocytogenes recombinant.

Les vaccins selon l'invention peuvent être administrés par voie intra-veineuse, sous-cutanée, intramusculaire ou orale.

Une dose appropriée se situe entre 5.10^4 et 10^9 cellules/kg de poids.

Cette dose varie en fonction de la voie d'administration ainsi que de la sensibilité de l'hôte.

5 L'administration est de préférence répétée afin de conférer une protection efficace à l'hôte.

Les mutants recombinants de Listeria monocytogenes définis ci-dessus sont également appropriés à la préparation d'une composition de diagnostic destinée au
10 contrôle de l'état de protection d'un hôte humain ou animal contre une infection provoquée par un microorganisme produisant un antigène correspondant à la protéine codée par l'ADN hétérologue inséré dans le génome de Listeria monocytogenes recombinant ou exprimé dans cette
15 souche lorsque porté par un plasmide.

Il suffira d'injecter localement la composition de diagnostic selon l'invention par voie sous-cutanée par exemple et d'observer après un certain temps de latence si une réaction inflammatoire a lieu ou non,
20 à la manière du test à la tuberculine utilisé pour contrôler l'état de protection d'un hôte contre le bacille de la tuberculose.

On décrira ci-après l'obtention de la souche mutante LUT 12 de Listeria monocytogenes ainsi que ses propriétés en se référant à la fig. annexée représentant:
25

A : l'opéron lécithinase de Listeria monocytogenes (Vasquez - Boland et al., 1992 (12) avec la position du transposon dans le mutant LUT 12.
30

B : la séquence d'acides aminés de la protéine codée par le gène act A.

Les traits noirs renforcés représentent des gènes dont les produits ont été caractérisés (mpl : metalloprotéase, Domann et al., 1991, (3) act A : (présente invention), plc B : lécithinase) ORFX, ORFY et ORFZ sont des cadres de lecture ouverte.

P : indique le promoteur, les lignes en pointillées le produit de transcription et un signal de terminaison de transcription potentiel.

La séquence signal potentielle et le segment transmembranaire sont soulignés. La région de motifs répétés est entourée. La flèche correspond à l'insertion de Tn 917-lac dans le gène actA du mutant LUT 12.

La numérotation débute à l'extrémité NH₂ de la protéine mature. Les résidus déterminés par microsé- quencage de la bande de 90 kDa sont imprimés en caractères gras et marqués par un astérisque.

I - Techniques générales de clonage et d'analyse d'ADN

Toutes les techniques de clonage et d'analyse ont été effectuées conformément aux protocoles standards (Sambrook et al. 1989 (10)) ou suivant les instructions du fabricant.

l'ADN chromosomique de Listeria monocytogenes a été préparé comme décrit par Mengaud et al., 1991 (b) (8). Les sondes pour Southern blot ont été préparées par PCR, purifiées à partir des gels d'agarose en utilisant le kit Geneclean (Bio 101, Inc, La Jolla, CA), et marquées en utilisant le système Multiprime d'Amersham.

Les hybridations selon Southern ont été réalisées à l'aide du système d'hybridation rapide (Amersham) sur des membranes de Nylon N (Amersham) dans un four pour hybridation Hybaid.

II - Isolement de la souche LUT 12 et détermination du point d'insertion du transposon

Une banque de mutants Tn 917-lac, produits à partir de la souche de type sauvage L028 et du plasmide p TV32 portant le transposon Tn 917-Lac comme décrit par Mengaud et al., 1991 a (7), a été criblée sur des plaques de gélose au jaune d'oeuf préparée à partir de jaune d'oeuf frais dilué au 1:2 dans une solution de NaCl 150 mM, et d'addition de 12,5 ml de ce mélange à 250 ml de gélose additionnée d'une infusion de cerveau et de coeur (BHI) à 56°C.

Un mutant lécithinase-négatif ne produisant pas d'opacification du jaune d'oeuf même après une incubation prolongée et montrant un phénotype de type sauvage pour tous les autres caractères examinés a été appelée LUT 12.

A - Caractéristiques biologiques de ce mutant

Ce mutant avait à la fois une activité hémolytique et un taux de croissance in vitro identiques au type sauvage, mais se révélait de virulence très atténuée chez la souris.

TOXICITE

La DL_{50} était plus élevée d'un facteur 4 log 10 que la DL_{50} des bactéries du type sauvage ($10^{8.55}$ bactéries au lieu de $10^{4.25}$).

TESTS DE FORMATION DE PLAGES SUR CULTURES DE FIBROBLASTES

Des essais ont été effectués sur des fibroblastes 3T3 (ECA CC88031146). selon la technique décrite par Kuhn et al., 1990 (5), sauf que les infections étaient réalisées à des concentrations variées d'inoculum : 1 à 25 μ l de sous-cultures bactériennes de 2 heures (A_{600nm} de 0,45) soit non diluées soit diluées au 1/10.

Cet essai révèle l'aptitude de Listeria monocytogenes à se multiplier de manière intracellulaire et à se disséminer sur des couches simples de fibroblastes revêtues d'une couche de gélose contenant de la gentamicine à une concentration létale pour les bactéries extracellulaires mais non pour les bactéries intracellulaires. Après plusieurs jours, des zones de cellules mortes détruites par l'infection bactérienne sont visibles à l'oeil nu sous forme de "plages".

Les bactéries LUT 12 mutantes étaient incapables à former des plages sur des couches simples de fibroblastes 3T3.

ESSAI DE DISSEMINATION SUR DES MACROPHAGES DE MOELLE OSSEUSE

Une observation au microscope optique de la dissémination de Listeria monocytogenes sur des couches simples de macrophages primaires de moelle osseuse a en outre été réalisée comme suit.

Des suspensions contenant des macrophages ont été préparées à partir de moelle osseuse d'une souris femelle C57BL/6 âgée de 7 semaines, et cultivées dans un milieu RPMI contenant 10% de sérum foetal de veau en présence de surnageant L. 4.10^5 macrophages dérivés de moelle osseuse obtenus au jour 6 ont été ensemencés dans les lamelles en verre rondes (diamètre 12 mm) la veille de l'utilisation. Les macrophages ont été infectés avec une MI (multiplicite d'infection) de 0,04 (une bactérie pour 25 macrophages, résultant en à peu près 1% de cellules infectées), de manière à pouvoir observer des points individuels d'infection, générés par la progéniture d'une seule bactérie. L'infection a été réalisée comme décrit pour un macrophage J774.

Après 30 minutes et après 8 heures, ces monocouches cellulaires ont été fixées et colorées avec une solution de Giemsa.

Après 8 heures, la progéniture des bactéries de type sauvage s'était disséminée à de nombreuses cellules hôtes nouvelles, et des bactéries portant des protubérances à leur extrémité pouvaient être observées.

5 Au contraire, la progéniture du mutant LUT 12 est restée enfermée à l'intérieur d'une seule cellule infectée. Les bactéries mutantes ont, soit formé des microcolonies ou étaient disséminées dans le cytoplasme des cellules hôtes, mais aucune protubérance contenant des bactéries

10 ne pouvait être détectée.

Ce résultat indique que la bactérie mutante se multiplie à l'intérieur des cellules infectées, mais est incapable d'infecter des cellules adjacentes par dissémination de cellule à cellule.

15 TEST DE CROISSANCE SUR DES MACROPHAGES J774

Un essai démontrant que la bactérie mutante LUT 12 était apte à se multiplier de manière intracellulaire a été réalisé au moyen d'un test de croissance sur des macrophages J774.

20 Cet essai a été réalisé sur des couches simples de J774 dans des flacons de culture de tissus en matière plastique de 25 cm³. Les cellules étaient infectées avec une MDI de 10 bactéries par cellule. Le nombre de bactéries intracellulaires était calculé après

25 2, 6 et 10 heures de croissance sur un milieu contenant de la gentamicine (5 µg/ml) par lyse des mono-couches cellulaires, lavage avec de l'eau distillée froide et étalement de dilutions appropriées sur des plaques contenant un milieu BHI.

30 Après une durée de 10 heures, les courbes de croissance des bactéries de type sauvage et LUT 12 étaient identiques.

OBSERVATIONS AU MICROSCOPE ELECTRONIQUE

Le comportement intracellulaire du mutant LUT

35 12 a été observé au microscope électronique. Des macro-

phages J774 étaient infectés avec des bactéries de type sauvage ou la souche mutante pendant 30 minutes, suivie par une incubation de 60 à 210 minutes dans un milieu contenant la gentamicine. Pour le mutant et le type sauvage, on pouvait observer des bactéries libres dans le cytoplasme à 1 h 1/2 d'infection. A ce moment, le type sauvage et le mutant étaient entourés par une couche mince de matériel granulaire crêpelé, mais seul le type sauvage comportait du matériel filamentaire assemblé à sa surface, constitué de filaments d'actine. A 4 h après l'infection, les bactéries de type sauvage étaient entourées par d'épaisses couches de filaments d'actine F. Au contraire, les bactéries mutantes LUT 12 étaient presque nues. Même le revêtement fin crêpelé observé au moment précoce de l'infection avait disparu.

Pour visualiser l'association d'actine F bactérienne de manière spécifique, les auteurs ont réalisé des colorations en double fluorescence à l'aide de FITC-phalloïdine, une toxine fongique se liant à l'actine F, et avec un sérum anti-L.monocytogenes, suivi par un second anti-corps couplé à la rhodamine, pour détecter les bactéries. Les macrophages J774 étaient infectés depuis 4h avec les bactéries de type sauvage ou mutant. Tandis que les bactéries de type sauvage se coloraient positivement avec la FITC-phalloïdine, les bactéries mutantes LUT 12, bien que détectables avec le sérum anti-L.monocytogenes restaient invisibles avec la coloration de l'actine.

Ces résultats démontrent que les bactéries LUT 12 s'échappent des phagosomes aussi efficacement que les bactéries de type sauvage et se multiplient dans le cytoplasme. Cependant, les bactéries mutantes ne sont jamais associées avec de l'actine F, sont incapables de se déplacer à l'intérieur de la cellule, et ne peuvent infecter des cellules voisines par dissémination directe.

Ces observations suggèrent que le mutant LUT 12 est déficient en un composant nécessaire pour le procédé de formation de filaments d'actine induit par Listeria monocytogenes.

5 B - DETERMINATION DU POINT D'INSERTION DU TRANSPOSON

Ce mutant a été analysé par Southern blot pour déterminer le nombre de transposons insérés dans son chromosome.

10 L'ADN chromosomique a été digéré par Bam HI, Eco RI, Hind III, Kpn I et Pst I.

On a utilisé deux sondes différentes correspondant à Tn 917-lac (Shaw et Clewell, 1985 (11)): une sonde recouvrant 515 paires de bases du gène de résistance à l'érythromycine, obtenue par PCR avec les
15 oligonucléotides 5'-TTG GAA CAG GTA AAG GGC ATT TAA-3' (position 821 à 844) et 5'-AGT AAA CAG TTG ACG ATA TTC TCG-3' (position 1313 à 1336), et une sonde recouvrant le fragment interne Hind III du transposon obtenue par PCR avec les oligonucléotides 5'-ACA ATT AAT GTC TCC CAT
20 ATT-3' (position 3082 à 3102) et 5'-(ACT GAT AAT TAA CCA AAA CAG-3' (position 4295-4315).

La jonction transposon-chromosome a été clonée à partir d'une banque d'ADN chromosomique obtenue par restriction avec Eco RI/Kpn I dans pUC 18. Un clone
25 comportant un segment d'insertion, correspondant à la jonction chromosome-transposon a été isolé et séquencé directement à partir du plasmide par utilisation d'un oligonucléotide s'hybridant avec l'extrémité droite du transposon (5'-CTA AAC ACT TAA GAG AAT TG-3', position
30 5244 à 5263).

Le transposon était inséré après l'adénine 497 dans la séquence nucléotidique du fragment Hind III - Eco RI du gène act A de l'opéron identifié par Mengaud et al., 1991 (b) (8), dont la séquence nucléotidique a
35 été décrite par Vazquez-Boland et al., 1992 (12).

Le point d'insertion du transposon Tn 917-lac est représenté sur le schéma de la fig. (A).

Le phénotype lecithinase-négatif du mutant LUT 12 est vraisemblablement dû à un effet polaire de la mutation par insertion dans act A, dans la mesure où le 3ème gène de l'opéron plcB code pour la lecithinase.

Des études complémentaires ont été réalisées qui ont démontré que la perte de l'activité de polymérisation de l'actine était bien due à une perte d'expression du gène Act A.

Des mutants ont été réalisés par recombinaison homologue entre le chromosome de Listeria monocytogenes et des fragments correspondant à des parties du gène plcB et des cadres de lecture ouverte ORFX/Y et ORFZ (fig. (A)) situés en aval du gène act A par insertion de plasmides en divers sites.

Des études d'immunofluorescence par utilisation de FITC-phalloïdine et marquage à la rhodamine de bactéries dans des macrophages J 774 infectés ont montré que les mutants plcB, ORFX/Y et ORFZ étaient associés à des filaments d'actine F tout comme les bactéries de type sauvage. Ces études ont été complétées par des études de microscopie électronique qui ont montré que ces mutants étaient aptes à stimuler l'assemblage de l'actine de la même manière que le type sauvage.

Ces analyses montrent par conséquent que des mutations en aval de act A n'affectent pas l'assemblage de l'actine A et suggèrent que l'incapacité du mutant LUT 12 à polymériser l'actine cellulaire est due à l'absence d'expression du gène act A.

Une transformation du mutant LUT 12 réalisée avec act A montre par ailleurs que le phénotype de type sauvage est restauré, ce qui exclut la possibilité d'une mutation spontanée en un autre site du chromosome.

Ces résultats démontrent ainsi que le produit

du gène act A est nécessaire pour l'assemblage de l'actine de Listeria monocytogenes et par conséquent pour son pouvoir pathogène.

Le produit du gène act A a été déterminé
5 comme décrit ci-après :

III - Analyse du produit du gène act A

La séquence nucléotidique du gène act A
10 laisse supposer que celui-ci code pour une protéine de 639 aminoacides avec une séquence signal et une région transmembranaire (Vazquez Boland et al., 1992 12()).

Des études complémentaires ont été réalisées d'une part par analyse comparée des protéines de surface
15 de Listeria monocytogenes de type sauvage et de la souche LUT 12.

Les isolats bactériens ont été cultivés dans 200 ml de bouillon d'infusion cerveau-cœur (BHI, Laboratoires DIFCO, Detroit, Michigan) additionné
20 d'érythromycine à 5 µg/ml pour LUT 12, sous agitation à 160 tpm sur un agitateur Gyrotory G10 (New Brunswick Scientific) à 37° C pendant 18 h.

Les bactéries ont été récoltées par centrifugation (5000 g pendant 20 minutes) et lavées à trois
25 reprises dans une solution saline de tampon phosphate (PBS).

Le culot obtenu a été remis en suspension dans 4 ml de PBS et du SDS a été ajouté à une concentration finale de 1 %. A cette concentration de SDS, les
30 cellules de L. monocytogenes ne se lysent pas. L'absence de lyse bactérienne a été vérifiée au microscope. Après 5 minutes d'agitation à température ambiante, les bactéries ont été centrifugées (50.000 g pendant 10 minutes) et le surnageant concentré par ultrafiltration
35 sur des microconcentrateurs (Centricom 30, Amicon) et

conservé à -20°C .

La concentration en protéines a été déterminée à l'aide de la méthode à l'acide bicinchoninique (Pierce). La concentration en protéines a été ajustée à 300 $\mu\text{g/ml}$ pour l'électrophorèse. 10 μl d'extrait ont été mélangés avec 10 μl de tampon (SDS à 2 %, glycérol à 10 %, mercaptoéthanol à 5 %, bleu de bromophénol à 0,002 % et Tris HCl 0,02 M), bouillis pendant 3 minutes à 100°C . L'électrophorèse a été effectuée à 60 mA pendant 120 minutes à travers des gels discontinus de polyacrylamide (Laemmli, 1970 (6)). les bandes ont été visualisées par coloration à l'argent (Heukeshoven et Dernick, 1985 (4)).

Pour le marquage de la surface cellulaire, on a centrifugé 400 ml d'une culture de 18 heures de L. monocytogenes; les bactéries ont été lavées à 3 reprises avec PBS à pH 7,4 et remises en suspension dans 8 ml de PBs PH 8,0 à 4°C .

Les bactéries ont ensuite été traitées avec de la sulfosuccinimido biotine (sulfo-NHS-biotine; Pierce) à une concentration finale de 0,5 mg/ml pendant 2 minutes sous agitation modérée.

Les cellules ont été lavées à trois reprises avec PBS à pH 7,4 et extraites par extraction au SDS.

Les extraits correspondant à 7 μg de protéines par couloir ont été déposés sur des gels SDS et transférés comme décrit par De Rycke et al., 1989 (2) sur nitrocellulose (BA 85, Schleicher et Schüll. Les filtres de nitrocellulose ont été saturés pendant une nuit dans PBS à 0,5 % de gélatine et incubés pendant 1,5 heure avec de la streptavidine conjuguée à de la peroxydase (Jackson) dans du PBS contenant 0,5 % de gélatine et 0,1 M de Tween 20. Après différents lavages dans le même tampon, les bandes réactives ont été révélées avec 0,5 mg/ml de 4-chloro-1-naphtol (Biorad) et 0,03 % v/v d' H_2O_2 dans l'eau.

Les analyses des gels d'électrophorèse montrent un bande de 90 kDa pour le type sauvage qui est absente chez la souche LUT 12. Cette bande est également retrouvée chez les mutants plcB et les mutants LUT 12 transformés par act A mentionnés ci-dessus.

Les analyses de marquage de surface par la sulfosuccinimido-biotine montrent de façon directe une protéine biotinylée de 90 kA chez les bactéries du type sauvage qui est absente chez la souche mutante LUT 12.

Pour identifier sans ambiguïté la protéine 90 kDa, la bande de 90 kDa a été isolée et la séquence des 6 aminoacides de l'extrémité NH₂ a été déterminée et comparée avec la séquence d'acides aminés déduite de la séquence nucléotidique du gène act A.

Les extraits sur SDS correspondant à 100 µg de protéines par canal ont été mis à bouillir dans un tampon d'échantillonnage SDS contenant 7 % (p/v) d'urée avant de réaliser une électrophorèse sur des gels au SDS à 7,5 %.

Les protéines séparées ont été transférées sur une membrane Problott (Applied Biosystems) dans du Tris 50 mM - borate 50 mM pendant 17 heures à 4 à 5 volts/cm. Les protéines ont été colorées pendant 5 secondes à l'aide de noir amido à 0,1 % dans une solution d'acide acétique à 1 % et de méthanol à 40 %, et rincées soigneusement à l'eau. Une bande de 90 kDa a été découpée dans plusieurs couloirs. Les protéines de la membrane ont été séquencées par dégradation selon Edman dans un séquenceur 740 A d'Applied Biosystems, avec, en ligne un analyseur HPLC PTH 120 A programmé par le fabricant pour la membrane Problott. Les séquences d'acides aminés ont été analysées sur un ordinateur Data General MV 10000 à l'Unité d'Informatique Scientifique de l'Institut Pasteur.

La séquence Ala-Thr-Asp-Ser-Glu-Asp de la

protéine isolée correspond exactement aux amino-acides du site de clivage de la séquence signal de prédite d'après la séquence peptidique-prédite à partir du gène act A (fig. B).

5 Par conséquent, le produit mature du gène act A est une protéine de 610 aminoacides avec un poids moléculaire calculé de 67 kDA. Elle a un poids moléculaire apparent de 90 kDA et est exprimée à la surface de la bactérie.

10 Cette protéine est nécessaire à l'assemblage de l'actine F et son absence conduit à une atténuation très importante de la virulence de Listeria monocytogenes. Par conséquent, toute mutation affectant le gène act A ou son promoteur et modifiant sensiblement ou empêchant
15 l'expression de son produit permettra l'obtention d'une souche atténuée non pathogène conformément à l'invention.

On rapportera ci-après les résultats obtenus in vivo avec la souche LUT 12 sur la protection de souris contre une infection par Listeria monocytogenes.

20

IV - Effets, in vivo, de la souche LUT 12 : étude chez la souris

A/ Multiplication du mutant actA dans le foie et la rate de souris infectées.

25 Le comportement de LUT 12 a été étudié, après injection intraveineuse, dans la rate et le foie de souris, qui sont les principaux organes cibles où L. monocytogenes de type sauvage expriment leur pathogénicité. Les essais cliniques utilisés étaient les suivants : les foies et rates des souris infectées étaient
30 récoltés à différents moments après l'infection, et homogénéisés pour permettre la libération de bactéries, et les bactéries vivantes étaient comptées in vitro.

35 La DL₅₀ du mutant actA LUT 12, après injection intraveineuse chez des souris C3H de lignée pure était

plus élevée d'un facteur $3 \log_{10}$ que celle de Listeria monocytogenes de type sauvage ($2,5 \times 10^7$ contre $2,5 \times 10^4$).

Les cinétiques de croissance du mutant actA et de la souche virulente de type sauvage dans le foie et la rate ont été comparées. Après injection intraveineuse d'une dose maximum sub létale du mutant actA ($1,5 \times 10^7$ organismes) ou de deux doses différentes de L. monocytogenes virulentes (7×10^3 ou 6×10^4), le nombre de bactéries dans le foie et dans la rate des souris infectées a été déterminé à des durées variables au cours de l'infection.

Une augmentation du nombre de mutant actA a été observée dans la rate pendant les 24 premières heures, mais cette augmentation était limitée ($1 \log_{10}$) en comparaison avec l'augmentation d'un facteur $4 \log_{10}$ observée avec la souche de type sauvage. A partir du jour 1, le nombre de bactéries mutantes actA a rapidement diminué et au jour 5, presque aucune bactérie ne pouvait être récoltée à partir de la rate. Au contraire, la souche sauvage de Listeria monocytogenes pouvait toujours être détectée dans cet organe aux jours 9 à 10 de l'infection. Dans le foie, le nombre de bactéries mutantes actA a persisté à un niveau stable jusqu'au jour 4, et après cela a diminué rapidement ; au contraire, le nombre de Listeria monocytogenes de type sauvage a augmenté d'un facteur de $2 \log_{10}$ avant d'atteindre un plateau pendant 6 à 7 jours.

La persistance du mutant actA à un niveau stable pendant 4 jours dans le foie peut refléter soit un équilibre entre la multiplication bactérienne et la mort bactérienne, ou une survie des bactéries sans multiplication. Pour faire la différence entre ces deux possibilités, les courbes de croissance bactérienne dans le foie et dans la rate de souris traitées par l'ampicil-

line ont été comparées à celles de souris témoins. L'ampicilline inhibe la synthèse du peptidoglycane et est bactéricide sur des bactéries en phase de multiplication active. Les souris infectées ont été traitées à deux reprises avec 15 mg d'ampicilline par voie intrapéritonéale à partir du jour 1, 2 ou 3 de l'infection ; le foie et la rate ont été prélevés un jour plus tard, et le nombre de bactéries restantes a été déterminé et comparé avec celui obtenu à partir de souris non traitées par l'antibiotique.

Après un tel traitement, le nombre de bactéries actA a diminué brutalement dans la rate au jour 2, et dans le foie aux jours 2 et 3, mais aucune différence entre la courbe de croissance témoin n'a été trouvée aux jours 3 et 4 dans la rate, ou au jour 4 dans le foie.

Ces résultats suggèrent que la persistance du mutant actA dans le foie est due à un équilibre entre la multiplication bactérienne et la mort. Etant donné que les mutants actA sont déficients en ce qui concerne la dissémination de cellule à cellule, in vitro, la persistance de actA dans le foie est vraisemblablement due à une infection de cellules voisines après lyse des premières cellules hôtes infectées ; par conséquent, Listeria monocytogenes peut être exposée à des effecteurs bactéricides présents dans un milieu extracellulaire et sa capacité de dissémination locale peut être diminuée.

En outre, si des Listeria monocytogenes extra-cellulaires sont phagocytées par des macrophages activés par l'interféron γ , elles peuvent être incapables d'atteindre le cytosol et de poursuivre leur cycle intracellulaire.

Finalement, les mutants actA ont été éliminés de la rate et du foie plus tôt que la souche de type sauvage, suggérant que les effecteurs protecteurs de

l'hôte sont rapidement induits chez la souris infectée avec le mutant actA.

B/ Effets d'une infection unique avec le mutant actA sur l'induction d'une immunité persistante.

5 L'existence d'une résistance non spécifique due à l'activation des macrophages est un phénomène bien connu, survenant rapidement et de manière transitoire chez des souris "récupérant" d'une infection sublétales.

10 Dans le but d'éviter de détecter simultanément des effets de l'immunité non spécifique et spécifique, les inventeurs ont déterminé à quel moment la résistance non spécifique cessait de s'exprimer.

Ils ont injecté par voie intraveineuse un pathogène intra-cellulaire non apparenté, Yersinia enterocolitica Ye8081 O:8 (16,17) soit chez des souris
15 naïves, soit chez des souris infectées avec le mutant actA, 4, 6,5, et 8,5 semaines avant l'injection. Ils ont comparé le nombre de bactéries dans la rate et dans le foie dans ces deux groupes de souris. Aucune différence
20 n'a été observée entre les deux groupes à chaque moment du test. Ils ont alors réalisé les expériences suivantes, 6 semaines ou plus après l'infection avec le mutant actA.

Premièrement, la DL_{50} de L. monocytogenes de type sauvage a été déterminée chez des souris infectées
25 6 semaines auparavant avec le mutant actA, et chez des souris témoins : une différence d'un ordre de 100 a été observée entre les deux groupes ($2,2 \times 10^6$ et $2,5 \times 10^4$ respectivement).

Deuxièmement, les courbes de croissance de
30 L. monocytogenes de type sauvage ont été comparées dans le foie et la rate de souris naïves et de souris immunisées depuis 6 semaines, ce pendant les 3 premiers jours de l'infection. Un ralentissement significatif de la croissance bactérienne a été observé à partir du jour 1
35 dans la rate, et à partir des jours 2 à 3 dans le foie.

Troisièmement, cette inhibition spécifique de la croissance de L. monocytogenes de type sauvage était encore efficace 8,5 semaines après l'infection avec le mutant actA (diminution de 4,01 \log_{10} dans la numération bactérienne de la rate 48 heures après un inoculum bactérien de 5×10^4).

Ces résultats montrent qu'une infection unique avec le mutant actA atténué est suffisante pour induire une immunité contre L. monocytogenes de type sauvage.

C/ Génération de lymphocytes T CD8⁺ protecteurs contre Listeria.

Un transfert de protection a été effectué chez des "récepteurs" syngéniques naïfs en utilisant des cellules de rate récoltées 7 jours après une injection intra-veineuse de $1,5 \times 10^7$ bactéries mutantes actA. Les "récepteurs" ont été exposés à une infection intraveineuse avec une dose létale de L. monocytogenes de type sauvage pendant 1 heure, et le nombre de bactéries a été déterminé dans le foie et dans la rate des "récepteurs" deux jours après l'infection.

Premièrement, l'injection de splénocytes de souris infectées avec le mutant actA a provoqué une diminution importante du nombre de L. monocytogenes de type sauvage récoltées à partir de la rate des "récepteurs" ayant reçu les cellules, et cet effet était dose-dépendant. La diminution du nombre de bactéries a également été observée dans le foie des "récepteurs", mais à un degré moindre (diminution de $1,00 \pm 0,45 \log_{10}$, $n = 4$, pour des transferts de 5×10^7 à $2,5 \times 10^8$ cellules, $P < 0,02$).

Dans le but de caractériser le phénotype des cellules de rate protectrices, on a soustrait dans la population cellulaire splénique immunitaire, soit des

lymphocytes Thy-1⁺, soit CD4⁺, soit CD8⁺, avant le transfert passif (Tableau 1 ci-dessous). Le transfert des splénocytes non soustraits a résulté en une réduction de 3 à 4 log₁₀ du nombre de bactéries dans la rate. Cette protection était transférée par les lymphocytes T, car une déplétion en lymphocytes Thy-1⁺ a aboli la diminution de la charge des bactéries dans la rate. Le niveau élevé de protection conférée par des splénocytes immuns après 7 jours n'était que peu affecté par la déplétion de la sous-population CD4. La majorité de l'effet protecteur conféré par les splénocytes immuns après 7 jours était sensible à une déplétion de la sous-population de CD8, mais ne pouvait pas être mis sur le compte uniquement de la sous-population de lymphocytes CD8⁺.

Dans la mesure où la déplétion en Thy-1 a supprimé la protection, et où la déplétion en CD4 n'a eu qu'un effet marginal, on peut considérer qu'une partie du rôle protecteur non CD8 dépendant est due aux lymphocytes T doublement négatifs, comme cela a déjà été observé par DUNN et NORTH (18). Des expériences publiées auparavant de déplétion/protection sur des cellules lymphoïdes isolées de souris récupérant d'une infection avec L. monocytogenes de type sauvage ont montré que L. monocytogenes de type sauvage était capable d'induire une protection qui était presque exclusivement due à des lymphocytes CD8⁺, et que ces lymphocytes CD8⁺ protégeaient sans la participation de lymphocytes CD4⁺.

Le mutant actA de L. monocytogenes est ainsi capable d'induire la génération de lymphocytes CD8⁺ spécifiques, protégeant contre Listeria.

Le mutant actA possède un gène de la listériolysine-O fonctionnel qui lui permet de s'échapper du phagosome et d'entrer dans le cytosol ; il est probable que le mutant actA est capable de stimuler la production de lymphocytes T CD8⁺ protecteurs contre Listeria, recon-

naissant des peptides naturels de L. monocytogenes. En outre, la capacité du mutant actA à se multiplier de manière transitoire dans les organes des souris infectées et de sécréter une quantité suffisante de protéines bactériennes est probablement critique pour permettre une production efficace des lymphocytes CD8⁺ protecteurs.

Le transposon Tn917-lac s'est inséré dans actA, le second gène de l'opéron lécithinase, et a un effet polaire sur l'expression du gène plcB codant pour une lécithinase. Les résultats obtenus dans la présente invention indiquent que la lécithinase ne joue pas un rôle essentiel dans l'induction d'une immunité protectrice contre L. monocytogenes.

En conclusion, les résultats de la présente invention montrent que des mutants atténués actA sont capables d'induire des lymphocytes T CD8⁺ protecteurs contre *Listeria*, et qu'un état d'immunité protectrice contre L. monocytogenes de type sauvage peut être établi par une infection unique. Comme les mutants actA pénètrent dans le cytosol des cellules infectées et se multiplient dans ce compartiment, on peut considérer leur utilisation comme vecteur vivant pour délivrer des protéines hétérologues dans le cytosol et favoriser la production de lymphocytes T CD8⁺ ; de tels vecteurs vivants capables de se multiplier de façon transitoire sont supposés délivrer une charge suffisante de protéines hétérologues dans le cytosol, ce pendant une durée de temps courte. En plus de leur utilisation potentielle comme modèle pour le développement de vaccins mettant en oeuvre des vecteurs vivants, ces *Listeria* de virulence atténuée peuvent être utiles pour le criblage et la caractérisation de peptides bactériens ou parasitaires spécifiques d'allèles du locus codant pour les molécules de classe I du CMH. En effet, certaines bactéries et certains parasites résident dans les compartiments vacuo-

lares ; en outre, la cinétique de croissance peut être faible. Ainsi, pour les espèces de Leishmania ou les espèces de Mycobacterium, cet outil pourrait être très utile pour définir la spécificité des lymphocytes CD8⁺ qui sont produits en réponse à l'infection.

25

Induction de la "propagation de lymphocytes T CD8⁺
protecteurs par le mutant actA de *L. monocytogenes* dans la
rate de souris C3H

Expérience	Expérience 1 (5 x 10 ⁷ cellules)	Expérience 2 (1 x 10 ⁸ cellules)	Expérience 3 (2 x 10 ⁸ cellules)
Transfert de cellule	- + + +	- + + + +	- + + +
Transfert in vitro	- C' anti-CD4 + C' anti-CD8 + C'	- C' anti-Thyl + C' anti-CD4 + C' anti-CD8 + C'	- C' anti-CD4 + C' anti-CD8 + C'
<i>Listeria</i> log ₁₀ par cellule	6,70 ± 0,14 4,00 ± 0,19 4,60 ± 0,45 6,25 ± 0,39	6,51 ± 0,16 2,53 ± 0,32 6,16 ± 0,20 3,59 ± 0,34 4,89 ± 0,64	6,75 ± 0,21 2,51 ± 0,45 3,20 ± 0,32 5,36 ± 0,25
<u>VALEUR de P</u> Cellules traitées contre pas de cellules	- < 0,001 < 0,001 < 0,05	- < 0,001 NS < 0,001 < 0,01	- < 0,001 < 0,001 < 0,001
Cellules soustraites contre cellules traitées par C'	- - NS < 0,001	- - < 0,001 < 0,05 < 0,01	- - NS < 0,001

FEUILLE DE REMPLACEMENT

Les cellules spléniques ont été isolées à partir de souris C3H au jour 7 après injection intraveineuse de $1,5 \times 10^7$ mutants actA. Les cellules Thy-1⁺, CD4⁺ ou CD8⁺ ont été soustraites *in vitro* avant le transfert adoptif. Les anticorps monoclonaux utilisés ici étaient Anti-Thy-1, 2 J1j (ATCC TIB 184), anti-CD4 RL1724 (Ceredig, R. Lowenthal, J.W. Nabholz M. and MacDonald, H.R., 1985, *Nature* 314 98), et anti-CD8 31M (Sarmiento M. Glasebrook A.L. et Fitch F.W., 1980, *J. Immunol.* 125-2665). La déplétion était < 90% après chaque traitement cytotoxique par des anticorps monoclonaux (résultats non représentés). Les populations cellulaires non déplétées [complément (C')] ou déplétées ont été transférées chez des "récepteurs" naïfs syngéniques 1 heure après injection de $4 \text{ à } 8 \times 10^4$ *L. monocytogenes* de type sauvage. Les groupes témoins comprenaient des récepteurs de cellules non déplétées (c'est-à-dire incubées seulement avec C') et des récepteurs recevant seulement une injection de *L. monocytogenes* de type sauvage (c'est-à-dire pas de cellules). 48 heures après l'injection, les bactéries ont été comptées (moyenne + ET) dans la rate des "récepteurs" (3 à 5 souris par groupe). La signification statistique (test de Student) est rapportée pour l'efficacité du transfert (cellules traitées contre pas de cellules) et pour l'effet du traitement de déplétion sur l'efficacité du transfert (cellules déplétées contre cellules traitées par C').

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- 5 1. Mounier, J., Ryter, A., Coquis-Rondon, M. and Sanso-
netti, P. J. (1990). Intracellular and cell-to-cell
spread of *Listeria monocytogenes* involves interaction
with F-actin in the enterocyte-like cell line Caco-2.
Infect. Immun. 59, 1048-1058.
- 10 2. De Rycke, J., Phan-Thanh, L. and Bernard, S. (1989).
Immunochemical identification and biological characetri-
zation of cytotoxic necrotizing factor from *Escherichia*
coli. J. Clin. Microbiol. 27, 983-988.
- 15 3. Domann, E., Leimeister-Wächter, M. Goebel, W. and
Chakraborty, T. (1991). Molecular cloning, sequencing,
and identification of a metalloprotease gene from
listeria monocytogenes that is species specific and
physically linked to the listeriolysin gene. Infect.
20 Immun. 59, 65-72.
4. Heukeshoven, J. and Dernick, R. (1985). Simplified
method for silver staining of proteins in polyacrylamide
25 gels and the mechanism of silver staining. Electrophore-
sis 6, 103-112.
5. Kuhn, M., Prévost, M.-C., Mounier, J. and Sansonetti,
P.J. (1990). A nonvirulent mutant of *Listeria monocytoge-*
30 *nes* does not move intracellularly but still induces
polymerisation of actin. Infect. immun. 58, 3477-3486.
6. Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins
during the assembly of the heads of bacteriophage T4.
Nature 227, 680-685.

7. Mengaud, J., Dramsi, S., Gouin, E., Vazquez-Boland, J.-A., Milon, G. and Cossart, P. (1991a). Pleiotropic control of *Listeria monocytogenes* virulence factors by a gene which is autoregulated. *Mol. Microbiol.* 5, 2273-2283.
8. Mengaud, J., Geoffroy, C. and Cossart, P. (1991b). Identification of a novel operon involved in virulence of *Listeria monocytogenes*; its first gene encodes a protein homologous to bacterial metalloproteases. *Infect. Immun.* 59, 1043-1049.
9. Racz, P., Tenner, K. and Szivessy, K. (1970). Electron microscopic studies in experimental keratoconjunctivitis listeriosa. I. Penetration of *Listeria monocytogenes* into corneal epithelial cells. *Acta Microbiol. Acad. Sci. Hung.* 17, 221-236.
10. Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual.* (Cold Spring Harbour, New York: Cold Spring Harbour Laboratory Press).
11. Shaw, J.H. and Clewell, D.B. (1985). Complete nucleotide sequence of macrolide-lincosamide-streptogramin-B-resistance transposon Tn917 in *Streptococcus faecalis*. *J. Bact.* 164, 782-796.
12. Vazquez-Boland, J.-A., Kocks, C., Dramsi, S., Ohayon, H., Geoffroy, C., Mengaud J., and Cossart, P. (). Nucleotide sequence of the lecithinase operon of *Listeria monocytogenes* and possible role of lecithinase in cell-to-cell spread. *Infect. Immun.*, Jan. 1992, p. 219-230.
13. Tilney, L.G. Connelly, P.S. and Portnoy, D. A. (1990). Actin filament nucleation by the bacterial

pathogen, *Listeria monocytogenes*, J. Cell. Biol. 111, 2979-2988.

- 5 14. Sullivan et al., Gene, 1984, 29, p. 21-26.
- 15 15. Leredus et al., Gene, 1991, 108, p. 115-129.
- 10 16. North, R.J. and Deissler, J.F., 1975, Nature of "memory" in T-cell mediated antibacterial immunity cellular parameters that distinguish between the active immune response and a state of "memory". *Infect immun.* 12 761.
- 15 17. Alonso J.M. Vilmer, E. Mazigh D. and Mollaret, H.M., 1980, *Yersinia enterocolitica* 03 Curr. Microbiol. 4 117.
- 20 18. Dunn P.L. and North R.J., 1991, Resolution of primary murine listeriosis and acquired resistance to lethal secondary infection can be mediated predominantly by Thy 1⁺ CD4⁻ CD8⁻ cells, J. Inf. Dis 164 869-871.

LISTE DES SEQUENCES

I - INFORMATION GENERALE

5

(1) DEMANDEUR : INSTITUT PASTEUR

(2) TITRE DE L'INVENTION :

Mutant atténué de Listeria monocytogenes,
souche recombinante de Listeria monocytogenes,
10 utilisation comme vecteurs hétérologues d'anti-
gène vaccinal et utilisation comme vaccin ou
composition diagnostique.

(3) NOMBRE DE SEQUENCES : 1

15 II - INFORMATION POUR SEQ ID N° 1

CARACTERISTIQUES DES SEQUENCES

TYPE : protéine

LONGUEUR : 610 aminoacides

TYPE DE MOLECULE : protéine de surface

20

ORIGINE

ORGANISME : Listeria monocytogenes

LIGNEE CELLULAIRE : LO 28

CARACTERISTIQUE

NOM DE LA PROTEINE : produit du gène Act A

25

III - DESCRIPTION DE LA SEQUENCE

~~-29 MGLWRENRASGVVITANCITINPDIIPA~~

1 ATDSEDSSLNTDEWEEKTEEQPSEVNTGPRIETAREVSSRDIKE
46 LEKSNKVRNTNKADLIAMLKEKAEGPNINNNNSEQTENAAINEE
91 ASGADRPAlQVERRHPGLPSDSAAEIKRRKAIASSDSELESITY
136 PDKPTKVNKKVAKESVADASESDLDSSMQSADESSPOPLKANQQ
181 PFFPKVFKKIKDAGKWVRDKIDENPEVKKAIVDKSAGLIDQLLTK
226 KKSEEVNAS
235 DFPPPPPTDEELRLALPETPMLLGFNAPATSEPSSF
270 EFPPPPPTDEELRLALPETPMLLGFNAPATSEPSSF
305 EFPPPPTEDELEIIRETASSLDSSFTRGDLASLRNAINRHSQNF
350 DFPPIPTEEELNGRGR
367 PTSEEFSSLNSG
379 DF TDDENSET
389 TEEEIDRLADLRORGTGKHSRNAGFLPLNPFASSPVPSL
428 SPKVSISAPALISDITKKTFFKNPSQPLNVFNKRTTITKTVTKKP
473 TPVKTAPKLAELPATKPOETVLRNKTPFIEKQAEYNKQSIMPS
518 LPVIOKEATESDKEEMKPTZERHVESESAMMANGNRSAGIEE
563 GKLIKSAEDEKAKEEPGNHTTLILAMLAIGVTSIGAFIKIIL
607 RKNN

SYMBOLES DES ACIDES AMINES

	A	Ala	alanine
5	C	Cys	citéine
	D	Asp	acide aspartique
	E	Glu	acide glutamique
	F	Phe	phénylalanine
	G	Gly	glycine
10	H	His	histidine
	I	Ile	isoleucine
	K	Lys	lysine
	L	Leu	leucine
	M	Met	méthionine
15	N	Asn	asparagine
	P	Pro	proline
	Q	Gln	glutamine
	R	Arg	arginine
	S	Ser	serine
20	T	Thr	thréonine
	V	Val	valine
	W	Trp	tryptophane
	Y	Tyr	tyrosine

REVENDICATIONS

1. Mutant atténué de Listeria monocytogenes comportant, dans le gène act A ou dans le promoteur de celui-ci, une mutation apte à bloquer ou modifier sensiblement l'expression de la protéine codée par le gène act A.
2. Mutant atténué de Listeria monocytogenes selon la revendication 1, caractérisé en ce que la mutation consiste en une insertion, une délétion ou une mutation par mutagenèse dirigée.
3. Mutant atténué de Listeria monocytogenes selon la revendication 1 ou la revendication 2, caractérisé en ce que la mutation consiste en l'insertion d'un transposon stable.
4. Mutant atténué de Listeria monocytogenes selon la revendication 3, caractérisé en ce que le transposon stable est le transposon Tn917-lac.
5. Mutant atténué de Listeria monocytogenes selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que la mutation est effectuée dans le fragment d'ADN codant pour la séquence peptidique à motifs répétés comprise entre les aminoacides 235 à 315, 350 à 360, 367 à 385 et 389 à 393 de la séquence SEQ ID n°1.
6. Mutant atténué selon l'une des revendications 1 à 4, caractérisé en ce que la mutation consiste en une insertion entre les aminoacides 61 et 62 de la séquence peptidique SEQ ID n° 1.
7. Mutant atténué de Listeria monocytogenes selon la revendication 6, dénommé LUT 12, déposé à la CNCM le 30 janvier 1992 sous le n° I-1167.
8. Vaccin humain ou vétérinaire, caractérisé en ce qu'il comprend en tant que composant actif une souche mutante atténuée de Listeria monocytogenes selon l'une des revendications précédentes.

FEUILLE DE REMPLACEMENT

9. Souche recombinante de Listeria monocytogenes, caractérisée en ce qu'elle comporte un ADN hétérologue, soit inséré dans le génome d'un mutant atténué selon l'une des revendications précédentes, soit porté par un plasmide qui se réplique dans le mutant atténué.

10. Souche recombinante selon la revendication 9, caractérisée en ce que l'ADN hétérologue consiste en un gène hétérologue codant pour un antigène protecteur cible de lymphocytes T de la sous-classe CD8.

11. Souche recombinante selon la revendication 10, caractérisée en ce que l'antigène est un antigène bactérien, notamment de mycobactéries.

12. Souche recombinante selon la revendication 10, caractérisée en ce que l'antigène est un antigène parasitaire, notamment de Leishmania, de Trypanosoma ou de Toxoplasma, Theileria.

13. Souche recombinante selon la revendication 10, caractérisée en ce que l'antigène est un antigène viral, notamment du VIH, du virus de la chorioméningite lymphocytaire ou du virus de la grippe.

14. Souche recombinante selon la revendication 13, caractérisée en ce que l'antigène est l'antigène gag et/ou l'antigène nef du VIH et/ou tout ou partie de l'enveloppe gp 120 du VIH1 ou gp 140 du VIH2.

15. Souche recombinante l'une des revendications 9 à 14, caractérisée en ce qu'elle comporte un promoteur de Listeria en amont de l'ADN hétérologue.

16. Souche recombinante selon la revendication 15, caractérisée en ce que le promoteur est le promoteur hly.

17. Souche recombinante selon la revendication 16, caractérisée en ce que l'ADN hétérologue est fusionné avec le début du gène hly, de manière à utiliser la séquence signal de la listériolysine O pour sécréter le produit de l'ADN hétérologue dans le cytoplasme de la

cellule hôte.

18. Vaccin humain ou vétérinaire recombinant, caractérisé en ce qu'il comprend en tant que composant actif une souche recombinante selon l'une des revendications 9 à 17.

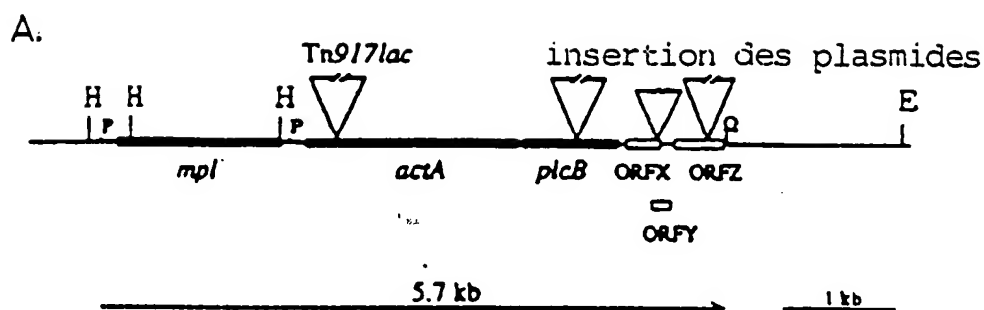
5

19. Composition de diagnostic comprenant une souche recombinante de Listeria monocytogenes selon l'une des revendications 10 à 17, pour le contrôle de l'état de protection d'un hôte humain ou animal contre une infection provoquée par un microorganisme comprenant un antigène sensiblement identique à celui codé par le gène hétérologue inséré dans la souche mutante recombinante ou porté par un plasmide se répliquant dans la souche mutante recombinante.

10

15

1/1



B.

-29 MGLNREMRRAMMVVFITANCITINPDIIFA

1 ATDS~~ED~~SSSLNTDEWEE~~E~~KTEEQPSEVNTGPRYETAREVSSRDIKE
 46 LEKSNKVRNTNKADLI~~AM~~LKEKA~~E~~KGNINNNNNSEQTENAAINEE
 91 ASGADRP~~AI~~QVERRHPGLPSDSAA~~E~~IKKRRKAIASSDSELES~~LT~~Y
 136 PDKPTKVNKKKVAKESVADASESDLDSSMQSADESSPQPLKANQQ
 181 PFFPKVF~~KK~~IKDAGKWVRDKIDENPEVKKAIVDKSAGLIDQLLTK
 226 KKSEEVNAS
 235 DFPPPPPTDEELRLALPETPMLLGFNAPATSEPSSF
 270 EFPPPPPTDEELRLALPETPMLLGFNAPATSEPSSF
 305 EFPPPPPTDELE~~I~~IRETASSLDSSFTRGDLASLRNAINRHSQNF~~S~~
 350 DFPPPIPT~~EE~~EELNGRGG
 367 PTSEEFSSLSNG
 379 DF TDDENSET
 389 TEEEDRLADLRDRGTGKHSRNAGFLPLNPFASSPVPSL
 428 SPKVSKI~~S~~APALISDITKTPFKNPSQPLNVFNKTTTKTVTKKP
 473 TPVKTAPKLAELPATKPOETVLRENKTPFIEKQAETNKQSINMP~~S~~
 518 LPVIQKEATESDKEEMKPQTEEK~~M~~VEESESANNANGKNRSAGIEE
 563 GKLIAKSAEDEKAKEE~~PG~~NHTTL~~L~~LAML~~A~~IGVESLGAFIKLIOL
 607 RKNN

FIG. 1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/FR93/00105

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int. Cl.⁵ : C12N 15/74; C12N 1/21; C12N 15/01; A61K 39/02 //C12N 15/31
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC (C12N 1/21, C12R1:01)

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int. Cl.⁵ : C12N; C07K; A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	INFECTION AND IMMUNITY. Vol. 58, No.11, November 1990, WASHINGTON US pages 3770-3778 A.N. SUN ET AL 'Isolation of listeria monocytogenes Small-plaque mutants defective for intracellular growth and cell-to-cell spread' *see the whole document in particular page 3775 left-hand column*	1-4
A	INFECTION AND IMMUNITY. Vol. 60, No.1, January 1992, WASHINGTON US pages 219-230 JOSE-ANTONIO VAZQUEZ-BOLAND ET AL 'Nucleotide sequence of the lecithinase operon of Listeria monocytogenes and possible role of lecithinase in cell-to-cell spread' cited in the application see page 226, right-hand column see page 228, right-hand column see abstract	1-4
A	INFECTION AND IMMUNITY ./.	1-4

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

23 June 1993 (23.06.93)

Date of mailing of the international search report

13 July 1993 (13.07.93)

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/FR93/00105

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
	Vol. 58, No.11, November 1990, WASHINGTON US pages 3477-3486 M. KHUN ET AL 'A non-virulent mutant of Listeria monocytogenes does not move intracellularly but still induces polymerization of actin' cited in the application see the whole document ---	
P,X	CELL. Vol. 68, 7 February 1992, CAMBRIDGE, MA US pages 521-531 C. KOCKS ET AL 'L. monocytogenes - induced Actin assembly requires the ActA gene product, a surface protein' see the whole document ---	1-19
P,X	EMBO JOURNAL. Vol. 11, No.5, May 1992, EYNSHAM, OXFORD GB pages 1981-1990 E. DOMANN ET AL 'A novel bacterial virulence gene in Listeria monocytogenes required for host cell microfilament interaction with homology to the proline-rich region of vinculin' see the whole document ---	1-2
A	MOLECULAR MICROBIOLOGY Vol. 5, No.9, 1991, pages 2273-2283 MENGAUD J. ET AL 'Pleiotropic control of Listeria monocytogenes virulence factors by a gene that is autoregulated' cited in the application see the whole document ---	1-4
A	JOURNAL OF BACTERIOLOGY Vol. 174, No.2, January 1992, pages 568-574 TRINAD CHAKRABORTY ET AL 'Coordinate regulation of virulence genes in Listeria monocytogenes requires the product of prfA gene' *see the whole article, especially pages 571 right-hand column lines 28-31, page 572 lines 41-49 and page 573 lines 3-10* -----	1-2

I. CLASSEMENT DE L'INVENTION (si plusieurs symboles de classification sont applicables, les indiquer tous) ⁷		
Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB		
CIB 5 C12N15/74; C12N1/21; C12N15/01; A61K39/02 //C12N15/31(C12N1/21,C12R1:01)		
II. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE		
Documentation minimale consultée ⁸		
Système de classification	Symboles de classification	
CIB 5	C12N ; C07K ; A61K	
Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où de tels documents font partie des domaines sur lesquels la recherche a porté ⁹		
III. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS ¹⁰		
Catégorie ^o	Identification des documents cités, avec indication, si nécessaire, ¹² des passages pertinents ¹³	No. des revendications visées ¹⁴
X	<p>INFECTION AND IMMUNITY. vol. 58, no. 11, Novembre 1990, WASHINGTON US pages 3770 - 3778 A. N. SUN ET AL 'Isolation of listeria monocytogenes Small-plaque mutants defective for intracellular growth and cell-to-cell spread' * le document en entier plus particulièrement page 3775 colonne de gauche *</p> <p style="text-align: center;">---</p> <p style="text-align: right;">-/--</p>	1-4
<p>^o Catégories spéciales de documents cités:¹¹</p> <p>"A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent</p> <p>"E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date</p> <p>"L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)</p> <p>"O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens</p> <p>"P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée</p> <p>"T" document ultérieur publié postérieurement à la date de dépôt international ou à la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention</p> <p>"X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive</p> <p>"Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier.</p> <p>"Z" document qui fait partie de la même famille de brevets</p>		
IV. CERTIFICATION		
Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée		Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale
23 JUIN 1993		13. 07. 93
Administration chargée de la recherche internationale OFFICE EUROPEEN DES BREVETS		Signature du fonctionnaire autorisé LE CORNEC N.D.R.

III. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS ¹⁴		(SUITE DES RENSEIGNEMENTS INDiques SUR LA DEUXIEME FEUILLE)
Catégorie ^o	Identification des documents cités, ¹⁶ avec indication, si nécessaire des passages pertinents ¹⁷	No. des revendications visées ¹⁸
A	<p>INFECTION AND IMMUNITY. vol. 60, no. 1, Janvier 1992, WASHINGTON US pages 219 - 230 JOSÉ-ANTONIO VAZQUEZ-BOLAND ET AL 'Nucleotide sequence of the lecithinase operon of <i>Listeria monocytogenes</i> and possible role of lecithinase in cell-to-cell spread' cité dans la demande voir page 226, colonne de droite voir page 228, colonne de droite voir abrégé</p> <p>---</p>	1-4
A	<p>INFECTION AND IMMUNITY. vol. 58, no. 11, Novembre 1990, WASHINGTON US pages 3477 - 3486 M. KUHN ET AL 'A non-virulent mutant of <i>Listeria monocytogenes</i> does not move intracellularly but still induces polymerization of actin' cité dans la demande voir le document en entier</p> <p>---</p>	1-4
P,X	<p>CELL. vol. 68, 7 Février 1992, CAMBRIDGE, MA US pages 521 - 531 C. KOCKS ET AL 'L. monocytogenes-induced Actin assembly requires the ActA gene product, a surface protein' voir le document en entier</p> <p>---</p>	1-19
P,X	<p>EMBO JOURNAL. vol. 11, no. 5, Mai 1992, EYNSHAM, OXFORD GB pages 1981 - 1990 E. DOMANN ET AL 'A novel bacterial virulence gene in <i>Listeria monocytogenes</i> required for host cell microfilament interaction with homology to the proline-rich region of vinculin' voir le document en entier</p> <p>---</p>	1-2
A	<p>MOLECULAR MICROBIOLOGY vol. 5, no. 9, 1991, pages 2273 - 2283 MENGAUD J. ET AL 'Pleiotropic control of <i>Listeria monocytogenes</i> virulence factors by a gene that is autoregulated' cité dans la demande voir le document en entier</p> <p>---</p>	1-4
	---	-/--

III. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS ¹⁴		(SUITE DES RENSEIGNEMENTS INDICUES SUR LA DEUXIEME FEUILLE)
Catégorie °	Identification des documents cités, ¹⁵ avec indication, si nécessaire des passages pertinents ¹⁷	No. des revendications visées ¹⁸
A	JOURNAL OF BACTERIOLOGY vol. 174, no. 2, Janvier 1992, pages 568 - 574 TRINAD CHAKRABORTY ET AL 'Coordinate regulation of virulence genes in Listeria monocytogenes requires the product of the prfA gene' * see the whole article , especially pages 571 right column lines 28-31 , page 572 lines 41-49 and page 573 lines 3-10 * -----	1-2